Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

ÜBER DAS VORKOMMEN VON CL.WELCHII IM KOT UND DARM KLINISCH GESUNDER SCHAFE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Klaus Tobesch
Tierarzt aus Troppau

Berlin 1966
Journal-Nr. 531

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

ÜBER DAS VORKOMMEN VON CL.WELCHII

IM KOT UND DARM KLINISCH GESUNDER SCHAFE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Klaus Tobesch
Tierarzt aus Troppau

Berlin 1966
Journal-Nr. 531

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0102

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	5
B. Literatur	6
a) Vorkommen und Verbreitung	6
b) Isolierung	12
c) Kulturelle und morphologische Eigenschaften von Cl.welchii	13
d) Toxinbildung	14
C. Eigene Untersuchungen	18
I. Material	18
a) Bestandsschafe	18
b) Schlachtschafe	19
II. Technik	21
a) Probenentnahme und Behandlung der Proben	21
b) Keimisolierung	21
c) Biochemische Testung	23
III. Stammdifferenzierungsmethoden	23
a) Prüfung der Toxine im Mäuseletaltest ohne Trypsinbehandlung	23
b) Prüfung der Toxine im Mäuseletaltest nach Trypsinbehandlung	25
c) Prüfung der Toxine im Neutralisationstest mit Typseren	26
D. Ergebnisse	28
a) Untersuchung von Schafen aus Schafhaltungen	28
b) Vorkommen von Cl.welchii im Darm von Schlachtschafen	35
E. Besprechung	41
F. Zusammenfassung	47
G. Literaturverzeichnis	49

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

A. Einleitung

Infektionen durch Cl.welchii treten bei allen Tierarten auf. Von den verschiedenen Haustierarten sind am häufigsten die Schafe betroffen. Doch ist es nicht immer leicht, die Cl.welchii-Infektionen zu diagnostizieren, denn das pathologisch-anatomische Krankheitsbild kann durch eine schnell beginnende Fäulnis verwischt werden. Der bakteriologische Nachweis von Cl.welchii aus dem Darm oder den Baucheingeweiden ist für die Diagnose nicht entscheidend, weil dieser Anaerobier auch im Darm gesunder Schafe vorkommt und postmortal in die blutreichen Organe eindringen kann.

Die Schwierigkeit, eine Aussage über eine tatsächlich abgelaufene Infektion durch Cl.welchii zu machen, soll dadurch zu beheben sein, daß ein Toxinnachweis im Darm oder in den blutreichen Organen wie Darmlymphknoten, Leber, Milz und Herz erbracht wird.

Da unser Wissen über das Vorkommen der verschiedenen Typen des Cl.welchii im Darm gesunder Schafe noch lückenhaft ist, wurde mir die Aufgabe übertragen, Kotproben von klinisch gesunden Schafen verschiedener Bestände und zu verschiedenen Jahreszeiten bakteriologisch auf das Vorkommen von Cl. welchii zu untersuchen. Dabei sollte im Falle des Nachweises festgestellt werden, um welche der 6 Typen es sich handeln könnte. Weiterhin sollte der Darm von klinisch gesunden Schlachtschafen untersucht werden, um festzustellen, in welchen Darmabschnitten das Cl.welchii hauptsächlich anzutreffen ist.

HENZE (35) wurde ein Fall einer Tonsillitis durch Cl.welchii Typ A bei einem Hund beschrieben. WEYMOUTH (48) und PARISH (39) berichteten über das Auftreten von Cl.welchii-Keimen beim Geflügel. WEYMOUTH will den Typ A bei Kapaunen gefunden haben. PARISH beschrieb nekrotische Enteritiden und Nekroseherde in Leber, Milz, Herz und Nieren von Geflügel. Aus dem nekrotischen und schwarz-rot verfärbten Jejunum und Ileum wurden Cl. welchii-Keime isoliert. Geringe Mengen der Keime wurden auch im Dickdarm gefunden. Alle übrigen Organe waren steril. Bei den gefundenen Cl.welchii-Stämmen handelte es sich nach Meinung von PARISH um B- und/oder C-Typen.

1952 wurde von COHRS und SCHULTE zit. nach ZEISSLER (53) auch ein Fall einer Typhlitis und Colitis beim Kaninchen veröffentlicht. In der Leber des Kaninchens wurden multiple Nekroseherde gefunden. Der Darm zeigte große Ähnlichkeit mit den Veränderungen, die beim Darmbrand des Menschen beobachtet werden. Als Erreger wurde Cl.welchii ermittelt.

Das Schwein kann ebenfalls an einer Infektion mit Cl.welchii erkranken, wobei besonders der Typ C als Ursache in Frage kommt. 1964 wurde von ADAMSE (1) über eine Infektion von Mastschweinen in Holland berichtet. Nach Verfüttern von Abfall einer Hühnerschlächterei an Mast- und Muttertiere gingen einige Tiere ein. Als Todesursache wurden Cl.welchii-Keime festgestellt. Der Typ und die Organe, aus denen die Keime isoliert wurden, wurden nicht angegeben. ADAMSE betonte ausdrücklich, daß die Abfälle vor dem Verfüttern erhitzt wurden, aber einige Tage bei warmen Wetter aufbewahrt worden waren.

Über Erkrankungen der Schweine an Cl.welchii durch den Typ C wird von FIELD und GIBSON (13) und von BARNES und MOON (3) aus Amerika berichtet. 1955 isolierten FIELD und GIBSON aus dem Dünndarm von Saugferkeln diesen Typ. Sie nahmen an, daß die Infektion der Muttersauen auf der Weide stattgefunden hatte. Durch den Kot der Muttersau wurde die Haut des Euters infiziert, und die Ferkel nahmen die Keime beim Saugen auf. Von BARNES und MOON wurden ebenfalls Ferkel als Träger von Cl.wel-

chii Typ C ermittelt. Sie berichteten von einem Bestand, der 1962/63 15-50% Ferkelverluste hatte. Voraussetzung für die Infektion der einige Tage alten Ferkel soll eine schlechte Hygiene in diesem Bestand gewesen sein. Die Temperatur der jungen Tiere war normal oder subnormal. Dem Besitzer fiel der Durchfall auf; dem Kot waren Blut, Schleim und nekrotische Schleimhautfetzen beigemischt. Bei der Sektion zeigte sich, daß das Jejunum schwarz-rot verfärbt war und graue Nekroseherde enthielt. Die Schleimhaut war oedematisiert. Aus den veränderten Darmteilen wurden Cl.welchii-Keime Typ C isoliert.

Ebenso wie man diesen Anaerobier bei Saugferkeln ermitteln kann, gelingt dies auch bei Kälbern. GRINER und BRACKEN (17) stellten nach Verlauf einer akuten hämorrhagischen Enteritis bei 6 Kälbern 1952 den Typ C des Cl.welchii fest. Die Symptome traten erst 2-4 Stunden vor dem plötzlichen Tod auf. In allen Fällen handelte es sich um kräftige, gut entwickelte Kälber von besten Milchkühen. Im Jejunum und Ileum fand sich eine nekrotische und desquamierte Schleimhaut. Im Epicard, Zwerchfell, Labmagen und in der Pleura parietalis fielen Petechien oder Ekchymosen auf. Die Keime wurden aus dem Dünndarm isoliert. Eine Enterotoxämie der Kälber beschreibt auch GREGORY (15). Es lag eine Infektion durch den Typ C vor. Dagegen sind von SCHOFIELD (43) bei Enterotoxämien der Kälber Cl.welchii-Keime des Types A aus dem Dunndarm isoliert worden. In diesen Fällen wurden außer der Enteritis typische Erscheinungen einer Septikämie beschrieben. Leber und Milz waren geschwollen, die Lunge war oedematisiert, und eine Epicarditis und Abomasitis wurden festgestellt.

1957 wurde von BÜHLMANN und BOLLER (10) in der Schweiz eine Mastitis diagnostiziert, die durch Cl.welchii hervorgerufen worden war. In Deutschland berichteten HEIDRICH und GROßKLAUS (23) 1959 von 2 Fällen von Mastitiden bei Rindern, die durch Cl.welchii hervorgerufen waren. Außer Fieber, Anorexie und Apathie zeigte sich am Euter eine Gasbildung, während am übrigen Tierkörper keine Veränderungen festgestellt werden konnten. Der Verlauf war perakut, und eine Therapie konnte nicht

mehr eingeleitet werden. Von RENK (40) wurden 1962 mehrere Fälle einer Mastitisinfektion durch Cl.welchii bei Rindern veröffentlicht. In 5 Fällen starben die Tiere nach Transporten oder nach dem Abkalben. RENK glaubte, daß eine Infektion im Puerperium oder durch Verletzungen der Vulva während des Transportes stattgefunden hätte. Die Feststellung des Types ist bei keiner der erwähnten Mastitisinfektionen vorgenommen worden.

Am häufigsten erkranken Schafe an einer Infektion mit Cl.welchii. Besonders die Typen B und D, aber auch C und A sind bei dieser Tierart als Erreger gefunden worden. Eine regionale Begrenzung einzelner Typen ist nicht anzunehmen. Man muß damit rechnen, daß Cl.welchii-Infektionen beim Schaf in allen Ländern vorkommen.

Die Enterotoxämie der Schafe, hervorgerufen durch Typ D, durfte im Vordergrund stehen. BULLEN (8) isolierte 1954 diesen Typ aus einem nicht näher bezeichneten Teil des Magen-Darm-Traktes gesunder Schafe. Von 100 Schafen wurden dabei 12 D-Stämme in Reinkultur gewonnen. Untersuchungen auf Toxine des Cl.welchii bei den 100 Schafen ergaben, daß das ε-Toxin des Types D in folgenden Darmteilen und folgender Häufigkeit gefunden wurde:

Magen-Darm-Abschnitt	Häufigkeit von ε-Toxin im betr. Magen-Darm-Abschnitt
Rumen	19
Abomasus	15
Duodenum	14
Jejunum	17
Ileum	30
Colon	22

BULLEN sah in der Umstellung gesunder Schafe von eiweißarmer auf eiweißreiche Futterung einen prädisponierenden Faktor zur Auslösung einer Infektion mit Cl.welchii-Keimen. Die Entero-

Die Enterotoxämie, von den Engländern auch "overeating-disease" genannt, wurde lange Zeit in Deutschland als"Mastbradsot" oder "Eiweißvergiftung" bezeichnet. OPPERMANN (36) hält eine Infektion dann für möglich, wenn Tiere mit sporenhaltiger Erde in Berührung kommen, nachdem sie bei Kastrationen, beim Scheren oder durch Hundebisse verletzt worden sind. Auch erdhaltige Futtermittel werden als Infektionsquelle angenommen.

MEYN, BERGMANN und ENDREJAT (30) halten die Typen B und D als besonders gefährlich für Schafe. Verluste durch diese Typen sind in Deutschland jedes Jahr zu verzeichnen, aber es fehlen genaue bakteriologische Untersuchungen.

1954 gelang MITSCHERLICH, SEBETIČ und BEHRENS (33) bei Schafen, die an Cl.welchii-Infektionen eingegangen waren, die kulturelle Isolierung der Keime aus dem Dünndarminhalt und den Darmlymphknoten. Die Keime wurden als Typ D bestimmt. Ähnliche Untersuchungen machten MITSCHERLICH und BRATKE (31) 1957. BEHRENS (4) beobachtete das Auftreten der Enterotoxämie in der Merino-Schafzucht, wo hauptsächlich 6-14 Wochen alte Lämmer der Krankheit erlagen. Ein gehäuftes Auftreten der Enterotoxämie trat bei Mangel an Rauhfutter, im Frühjahr beim Austrieb auf satte Weiden, im Sommer auf Stoppelhutungen und im Frühherbst beim Weiden auf Kleezwischenfrucht- und Rübenfeldern auf. SEFFNER (44) weist auf ein gehäuftes Auftreten der Enterotoxämie im Vorsommer hin. Seinen Beobachtungen nach erkranken selten mehrere Tiere auf einmal. Neben dem Typ D ist auch oft mit anderen Typen zu rechnen. BERGMANN (5) beobachtete, daß manche Herden immer zur selben Jahreszeit befallen werden. Er machte den Turnus des Weideganges dafür verantwortlich.

Die Lämmerruhr (Typ B) wurde von MITSCHERLICH und KOHLER (32) 1953 in Deutschland beschrieben. 3 Wochen vor den ersten Symptomen, die in blutigen Durchfällen bestanden, war das Futter gewechselt worden. Bei der Sektion gefallener Lämmer wurde eine katarrhalisch-hämorrhagische Enteritis, Kachexie, Petechien in Dünndarm und Pansen und ein farbloses Oedem in

in der Nierengegend festgestellt. Cl.welchii-Keime wurden aus den Darmlymphknoten isoliert und als Typ B bestimmt.

MITSCHERLICH glaubt, daß E.coli, Salmonellen und Nekrosebazillen zum Darmkatarrh führen und damit die Lämmerruhr vorbereiten.

Neben den Typen B und D tritt auch der Typ C als Krankheitserreger in Deutschland auf. DEDIE, SCHEIBNER und PREUß (11) beobachteten tödliche Infektionen bei 40 Tieren einer Herde in 11 Tagen. Bei diesen 40 Tieren handelte es sich um Mutterschafe, Lämmer und Jungböcke. Aus der Leber, den Darmlymphknoten und dem Darminhalt wurden Cl.welchii-Keime isoliert und mit antitoxischen Seren als Typ C bestimmt. DEDIE, SCHEIBNER und PREUß stellten dabei fest, daß es bei eingesendeten Tieren oft nicht mehr möglich war, Toxine im Darm nachzuweisen.

Von den 6 Typen des Cl.welchii sind die Typen B, C und D als Krankheitserreger bei Tieren anzusehen. Aber auch mit dem Vorkommen der Typen A und E ist zu rechnen. Typ E wurde aus dem Darm von 3 an Enterotoxämie gestorbenen Kälbern isoliert [BOSWORTH, zit. nach ZEISSLER (53)].

Lediglich der Typ F konnte bisher nur bei Menschen festgestellt werden [ZEISSLER und RASSFELD (54)]. HAIN (21) berichtet von Erkrankungen bei Menschen durch diesen Typ. Untersuchungen ergaben, daß der Typ F ein nicht seltener Darmbewohner des Menschen ist.

b) Isolierung

Die elektive Züchtung des Cl.welchii aus dem Darm bereitet im Hinblick darauf, daß die Darmflora reich an den verschiedensten Bakterienarten ist, erhebliche Schwierigkeiten. ZEISSLER (53), WILLIS (52), OAKLEY (35), MC GOWAN (28) und VAN HEYNINGEN (47) filtrieren das zu untersuchende Material und beimpfen mit dem gewonnenen Filtrat Fleisch- oder Leberbouillon, die anschließend 10-15 Min. bei 80°C erhitzt wird. In einer Vakuumvorrichtung wird das beimpfte Nährmedium bei 37°C 18-24

Stunden incubiert. Durch das Erhitzungsverfahren sollen alle anderen Keime, besonders Enterokokken und E.coli, ausgeschaltet werden.

Nach Vorbehandlung zur Isolierung des Untersuchungsmaterials werden für den kulturellen Nachweis von Cl.welchii die verschiedensten Nährmedien vorgeschlagen. ZEISSLER (53) erzielte die besten Erfolge mit Traubenzucker-Blut-Agar-Platten und Leber-Leber-Bouillon. WILLIS (52) benutzte einen Laktose-Eigelb-Milch-Agar, einen Blut-Agar und eine Fleisch-Bouillon. Er isolierte Cl.welchii besser, wenn er seinen Nährböden 200 µg/ml Neomycin-Sulfat zusetzte. Nach BLENDEN (7) ist ein Zusatz von Gentiana- oder Kristallviolett im Verhältnis 1:100000 zu Tryptose-Agar zur Hemmung des Wachstums anaerober Sporenbildner und anderer Darmbakterien nützlich. HALLMANN (22) gibt als geeignete Nährböden Kligler-Agar und Eisen-Harnstoff-Agar an. ROBERTSON und KEPPIE (42) verwendeten einen Nährboden aus EVANS-Pepton, NaCl, Glucose und Pferdeserum. WILDFUHR (51) benutzte Traubenzucker-Blut-Platten und Leber-Leber-Bouillon. Auch Pope-Bouillon nach KAHLFELD hat sich nach WILDFÜHR gut bewährt.

c) Kulturelle und morphologische Eigenschaften von Cl.welchii

Auf der am häufigsten verwendeten Traubenzucker-Blut-Agar-Platte zeigt Cl.welchii ein weitgehend typisches Aussehen der Kolonien. Sie sind knopfförmig, erhaben, in S-Form mit 2-4 mm Durchmesser. Die Kolonien sind von einem Wall umgeben. Anfangs haben sie ein fraisefarbenes, schwach durchscheinendes Aussehen. Bei O_2-Zutritt wechselt der Farbton von lehmfarben in oliv- bis resedagrün. Die Kolonien sind von einem schmutzig grau-braunen, undurchsichtigen, hämolytischen Hof umgeben, der durch proteolytische Fermente und Hämotoxin entsteht [OAKLEY (35)].

Beim Öffnen der Platten macht sich ein Geruch nach Buttersäure bemerkbar, die aus der Fermentierung der Glucose entsteht [ZEISSLER (53)]. Bei gewöhnlicher Nährbouillon werden die

Aminosäuren durch Enzyme abgebaut und bis zu CO_2 zerlegt, wobei Asparaginsäure zu α-Alanin und Glutaminsäure zu γ-Aminobuttersäure decarboxyliert wird [MEISTER (29)], ein Effekt, der papierchromatographisch zum Nachweis von Cl.welchii ausgewertet werden kann. Die CO_2-Bildung wird deutlich sichtbar, wenn die Nährbouillon mit Paraffin abgeschlossen wird. Nach 18stündiger Inkubation wird bei Wachstum von Cl.welchii der Stopfen gehoben und die Bouillon etwas aufgehellt.

Mikroskopisch zeigt sich Cl.welchii als ein unbewegliches, grampositives, 4 x o,5 μ großes Stäbchen mit abgerundeten Enden. In alten Kulturen können sich die Cl.welchii-Stäbchen gramlabil oder gramnegativ verhalten.

Cl.welchii soll in der Lage sein, Kapseln und Sporen zu bilden. Die Kapseln konnten bisher ganz selten im Gewebe oder im eiweißreichen Substrat (Serum) beobachtet werden [WILLIS (52), HALLMANN (22)]. Eine Sporenbildung bleibt bei der üblichen Züchtungstechnik meist aus.

d) Toxinbildung

Der morphologischen und kulturellen Einheitlichkeit des Cl.welchii stehen die verschiedenen Krankheitsbilder, die bei den verschiedenen Typen entstehen, gegenüber. Diese Tatsache erklärt WILSDON [nach OAKLEY (35)] damit, daß ein Komplex von Exotoxinen gebildet wird, die verschieden wirken. Heute wissen wir, daß Cl.welchii 12 verschiedene Toxine bildet. Diese werden mit griechischen Buchstaben bezeichnet. Kein Stamm ist in der Lage, das Toxinspektrum vollständig auszubilden, sondern es kommen immer nur einige Toxine in mehr oder weniger großen Mengen vor. Es werden 6 verschiedene Typen (A, B, C, D, E und F) unterschieden. Jeder Typ erzeugt ein Haupttoxin in größerer Menge und andere Toxine in geringerer Menge. Durch das Haupttoxin ist es im allgemeinen möglich, die Stämme zu differenzieren (s. Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht über die Eigenschaften und Wirkungen der 6 Cl.welchii-Typen [nach OAKLEY (35) und VAN HEYNINGEN (47)]

		stark letale Toxine				weniger oder nicht letale Toxine							
		α	β	ε	ι	γ	δ	η	θ	κ	λ	μ	ν
Typ	Toxinwirkung	Letal, hämolytisch, nekrotisch, Ca-abhängig, Lecithinase	Letal, nekrotisch, Trypsin inaktiviert	Letal, nekrotisch, Trypsin aktiviert	Letal, nekrotisch	Letal	Letal, hämolytisch	Letal (?)	Letal (?), hämolytisch, O_2-labil	Letal, nekrotisch, Kollagenase	Proteinase	Hyaluronidase	Desoxyribonuclease
A	Gasbrand (Mensch)	+++	–	–	–	–	–	(+)	++–	++	–	+–	+
B	Schaf-dysenterie	+	+++	++	–	+	+	–	+	–	+++	+	+
C	Schaf, Ferkel, Kalb, "struck"	+	+++	–	–	+	++	–	+	+	–	–	+
D	Entero-toxämie	+	–	+++	–	–	–	–	+	+–	+–	+–	+
E	Enterotoxämie (Kalb)	+	–	–	++	–	–	–	+	+	+	–	+
F	Enteritis necroticans (Mensch)	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+

++– oder +– = nur bei einigen Stämmen vorhanden

(+)= nur bei wenigen Stämmen vorhanden

Ebenso ungeeignet für die Typendifferenzierung sind die Agglutination, Praezipitation und Komplementbindungsreaktion [BERGMANN-RAPP (6)].

Nach OAKLEY (35) und WILLIS (51) läßt sich durch eine Trypsinbehandlung von toxinhaltigem Kulturfiltrat eine grobe Differenzierung der Typen B und D erreichen, da Trypsin das β-Toxin des B-Types inaktiviert und das ε-Toxin des D-Types aktiviert. MATTHES (27) bediente sich dieser Trennung beider Toxine, wobei er zur Testung der Toxine den Hauttest bei Kaninchen verwendete. MATTHES stellte fest, das es durch die Behandlung der Kulturfiltrate mit 5 gr% Trypsin möglich ist, die Typen B und D zu unterscheiden.

TZIMAS (46) untersuchte 1964 die Möglichkeit einer Differenzierung der 6 Typen des Cl.welchii im Mäuseletalitätstest. Mit dem Letaltest gelang ihm eine Einteilung der Stämme nach der toxischen Wirkung. Zu der Gruppe 1, die die stärksten Toxinbildner umfaßte, gehörten die Typen B und D. Der Gruppe 2 wurden die mäßig toxinbildenden Typen E und F zugeordnet. Zur 3. Gruppe gehören die Typen A und C, die sich als atoxisch erwiesen.

C. Eigene Untersuchungen

I. Material

Von 171 Schafen wurden Kot- oder Darminhaltsproben kulturell auf Cl.welchii untersucht. Bei 71 Schafen handelte es sich um Bestandsschafe, die in 5 Instituten gehalten wurden. Bei 100 klinisch gesunden Schlachtschafen wurde auf dem Schlachthof aus verschiedenen Darmabschnitten Inhalt entnommen.

a) Bestandsschafe

1964 wurden in den 5 Beständen 4 mal und zwar im Januar, Mai, Juli und Oktober Kotproben entnommen. Die Tiere waren mit Ohrmarken gekennzeichnet oder im Signalement bekannt.

Tabelle 2 Übersicht über die Verteilung der Schafe auf die 5 Bestände und ihre Bezeichnungen

Bestand	Schafe insgesamt	ausgewachsenen Tiere	Lammer (bis 3 Mon.)
1	6	1-4	5L,6L
2	10	TZ_1-TZ_5 BL_1, ML^5	TZL_6-TZL_8
3	20	01,06,50,54, 57,58,60,70, 103,106,107, 108,111,115, 406,701,808, 809,813,2416	
4	15	65,69,71,72, 73,75,99,474, 4005,5074, RX,RY	RL_1-RL_3
5	20	1AT-18RT	19ST,20TT
insges.	71	61	10

Der Nahrzustand der Schafe im Bestand 1 war gut. Die Tiere hatten geringen Auslauf ohne Graswuchs, und es bestand Kontakt zu Junghühnern, die gelegentlich von einem benachbarten Hühnerauslauf in den Schafstall und -auslauf gelangen konnten.

Im Bestand 2 weideten die Tiere auf einer größeren Grasfläche, zusätzlich erhielten die Tiere gemähtes Gras. Mit Schweinen war eine Berührung insofern vorhanden, als diese von Zeit zu Zeit auf gleicher Grasfläche weideten.

Im Bestand 3 wurden die Schafe in einem engen Vorraum gehalten und mit gemähtem Gras gefüttert. An den Tieren wurden Infektionsversuche mit verschiedenen Parasiten durchgeführt.

Die Schafe des Bestandes 4 kamen im Sommer auf eine Weide. Beim Austrieb war das Überqueren eines Schweineauslaufes notwendig.

Im Bestand 5 wurden die Schafe während des ganzen Jahres im Stall gehalten.

Das Winterfutter war in allen 5 Beständen etwa gleich und bestand aus Heu, Trockentreber, Rübenschnitzel oder Quetschhafer.

Von jedem der 71 Schafe wurden 6 Kotperlen mit dem Finger aus der Ampulle entnommen, wobei sterile Fingerlinge benutzt wurden, die bei jedem Schaf gewechselt wurden. Die Kotperlen wurden in sterile Reagenzröhrchen gefüllt, die mit Zellstoff verschlossen und mit Fettstift gekennzeichnet wurden.

b) Schlachtschafe

Bei 100 Schlachtschafen, die aus Niedersachsen, Schleswig-Holstein, Baden-Würtemberg und Bayern stammten, wurde nach der Schlachtung aus 4 verschiedenen Darmabschnitten Inhalt entnommen.

Bei den Schafen wurde der herausgelöste Darm am mittleren Teil des Jejunums (J), am Endabschnitt des Ileums (IL), ungefähr 10 cm cranial des Ostium ileocaecocolicum, in der Mitte des Caecums (C) und am Colon ascendens (CO) soweit angeschnitten, daß eine Entnahme des Darminhaltes durch Einführen eines sterilen Reagenzrohrchens möglich war. Dabei wurde mit dem Röhrchen an der Schleimhaut entlanggeschabt. Die Menge des meist flüssigen Darminhaltes betrug ca. 15 ml.

Sowohl im April als auch im Juni 1964 wurden je 25 Schafdärme an den 4 erwähnten Stellen geöffnet und die Darminhalte, getrennt nach dem Entnahmeort, untersucht. Insgesamt handelte es sich demnach um 50 Schafe und um 200 Proben.

Im August 1964 wurden von 50 Schafen Darminhaltsproben nur noch aus dem Caecum und Colon ascendens entnommen. Diese Proben wurden bei der Untersuchung zu einer zusammengefaßt und mit "D" bezeichnet.

Nachstehende Übersicht 1 veranschaulicht die Bezeichnung der Proben, die im April, Juni und August bei Schlachtschafen entnommen wurden.

Übersicht 1 Bezeichnung der 250 Darminhaltsproben von 100 Schlachtschafen

	Entnahmezeit:		
Bezeichnung der Darmabschnitte	April	Juni	August
Jejunum (J)	1 J-25 J	26 J-50 J	
Ileum (IL)	1IL-25IL	26IL-50IL	
Caecum (C)	1 C-25 C	26 C-50 C	
Colon asc.(CO)	1CO-25CO	26CO-50CO	
Dickdarm (D)			1 D-50D
insgesamt	100	100	50

II. Technik

a) Probeentnahme und Behandlung der Proben

Die von 71 Bestandsschafen entnommenen 6 Kotperlen wurden in einem Mörser unter Zusatz von 25 ml physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Die gewonnene Aufschwemmung wurde durch "Selecta" Faltenfilter 5597 1/2 (Firma Schleicher und Schüll) in Reagenzröhrchen filtriert, um die groben Bestandteile zurückzuhalten. Das Filtrat wurde dann für 30 Min. in ein Wasserbad von 80°C gestellt. Messungen im Röhrchen ergaben, daß das Filtrat nach 10 Min. die Temperatur von 80°C erreicht hatte. Diese Erhitzung des Filtrates auf 80°C für 20 Min. genügte, um die im Filtrat enthaltenen Keime der Coli-Enteritis-Gruppe und andere thermolabile Keime der Darmflora abzutöten. Nachdem die filtrierte und erhitzte Kotaufschwemmung auf Zimmertemperatur abgekühlt worden war, wurden 2 Normalösen der Suspension auf feste Nährböden ausgestrichen. Dabei wurde die Platinöse das erste Mal am Rand der Petrischale angesetzt und mit dicht aneinanderliegenden, fortlaufenden Linien über den Nährboden geführt. Die zweite Öse wurde meist auf der Mitte des Nährbodens angesetzt und wieder in dicht aneinanderliegenden Schlangenlinien über die zweite Hälfte des Nährbodens verteilt. Nach Herstellung einer Anaerobiose schloß sich eine Bebrütung bei 37,5°C an.

Mit dem Darminnalt der Schlachtschafe wurde in gleicher Weise verfahren. Der durchweg flüssige oder leicht breiige Inhalt wurde mit der doppelten Menge NaCl versetzt, filtriert und ernitzt. Zwei Normalösen wurden dann schließlich auf die Nährbodenplatten übertragen und in gleicher Weise wie vorher ausgestrichen.

b) Keimisolierung

Für die kulturelle Isolierung von Cl.welchii wurden folgende Nährböden verwendet:

1. <u>Traubenzucker-Schafblut-Agar</u> (10% defibriniertes Schafblut, 1% Glucose)

2. Leber-Leber-Bouillon (Le-Le) nach Tarozzi mit einem Paraffinpfropf zum Verschluß der Nährbodenoberfläche. Le-Le-Bouillon wurde entweder frisch hergestellt oder nach kurzer Aufbewahrungszeit verwendet. Aufbewahrte Le-Le-Bouillon wurde stets vor der Beimpfung aufgekocht und nach Abkühlung auf 50°C beimpft.

Bereits nach den ersten Untersuchungen ergab sich, daß diese beiden Nährmedien völlig für die Isolierung von Cl.welchii ausreichten und andere Nährsubstrate wie Thioglycollat-Bouillon oder Tryptose-Agar keine besseren Ergebnisse brachten.

Die Anaerobiose zur Isolierung von Cl.welchii wurde mit dem von OTT (37) inauguriertem Plattenverfahren mit einem in den Deckel der Schale eingelegten Bierfilz hergestellt. Bei diesem Verfahren wird der Bierfilz mit 10%iger Pyrogallol-Lösung getränkt. Nach Ablaufen des überschüssigen Pyrogallols wird der Filz mit 2 gr Pottasche beschickt und dann der Bodenteil mit dem beimpften Traubenzucker-Blut-Agar in den Deckel eingelegt. Die auf diese Art hergerichteten Platten wurden dann mit dem Deckel nach unten aufeinandergestellt und in den Brutschrank verbracht, wo zur Beschwerung ein 1-kg-Gewicht auf die oberste Platte gesetzt wurde. Die Bebrütung erfolgte 20 Stunden bei 37,5°C.

Am folgenden Tag wurden die Platten einer eingehenden Besichtigung auf Kolonien, die Cl.welchii-ähnlich waren, unterzogen. Durch das beim Beimpfen der Platten geübte Verdünnungsverfahren konnte fast immer das Wachstum auch von einzelnen Kolonien innerhalb von 20 Stunden erzielt werden. Kolonien, die einen grünlichen Farbton hatten und morphologisch den Kolonien des Cl. welchii entsprachen, wurden isoliert, abgestochen und auf Le-Le-Bouillon übertragen. Die Beimpfung dieses Flüssignährbodens geschah durch Abstechen einer Kolonie mit der Normalöse und Verbringen des Inokulums bei schräggehaltenem Röhrchen und unter Umgehung des verflüssigten Paraffins in die Nährbrühe. Bei der Le-Le-Bouillon-Kultur, die 20 Stunden bebrütet wurde, schloß sich nun eine Beurteilung der gebildeten Gasmenge unter dem Paraffinpfropfen an. Weiterhin wurde durch mikroskopische Un-

tersuchung (Grampräparat) sichergestellt, daß eine Reinkultur von Cl.welchii vorlag. Eine zweite Kontrolle wurde durch nochmaliges Überimpfen auf Traubenzucker-Blut-Agar durchgeführt, wobei die Anaerobiose wieder mit dem Pyrogallol-Pottasche-Verfahren hergestellt wurde.

Gelegentlich kam es vor, daß Mischkulturen erzielt wurden. In diesen Fällen wurde versucht, Reinkulturen von Cl.welchii zu gewinnen. In anderen Fällen ergab die weitere Differenzierung das Vorliegen von nicht interessierenden Fremdkeimen, und es wurde auf eine weitere Untersuchung verzichtet.

Nicht immer gelang es, in wenigen Passagen Reinkulturen zu erzielen. Doch war es in den meisten Fällen möglich, nach wenigen Passagen über Traubenzucker-Blut-Agar-Platten noch vorhandene Fremdkeime auszuschließen. Die halbstündige Erhitzung des Ausgangsmaterials auf 80°C erwies sich als ein brauchbares Verfahren, Cl.welchii elektiv zu isolieren.

c) Biochemische Testung

Isolierte Stämme, die auf Traubenzucker-Blut-Agar-Platten und in Le-Le-Bouillon Merkmale von Cl.welchii zeigten, wurden in Pepton-Wasser mit verschiedenen Zuckerarten und Alkoholen auf ihre fermentative Wirkung untersucht. Folgende Zucker wurden benutzt: Glucose, Galaktose, Laevulose, Saccharose, Lactose und Maltose, daneben die Alkohole Mannit, Dulcit und Isodulcit. Nach Beimpfung und 48stündiger Bebrütung der Röhrchen im evakuierten Exsikkator wurden jedem Röhrchen zwei Tropfen einer 0,02%igen wässrigen Phenolrotlösung zugesetzt.

III. Stammdifferenzierungsmethoden

a) Prüfung der Toxine im Mäuseletaltest ohne Trypsinbehandlung

Nachdem sichergestellt war, daß Cl.welchii vorlag, wurden die isolierten Stämme auf je zwei Röhrchen mit Le-Le-Bouillon überimpft, nach 20stündiger Bebrütung mit paraffiniertem Zellstoff-

pfropfen verschlossen und im Kühlschrank bei +5°C zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

Die Differenzierung der Stämme erfolgte mit den für die Routineuntersuchung geeigneten Methoden. Im Vordergrund stand der Mäuseversuch, wobei die letale Wirkung des Toxins durch intravenose Injektion unterschiedlicher Mengen des Kulturfiltrates 16stundiger Bouillonkulturen festgestellt wurde. Die Stämme wurden nach Aufbewahrung durch Überimpfen auf Traubenzucker-Blut-Agar-Platten aktiviert und auf Reinheit geprüft. Von den Platten wurde auf Le-Le-Bouillon überimpft. Nach Einschaltung einer weiteren Traubenzucker-Blut-Agar-Platte wurde eine Einzelkolonie auf einen flüssigen Nährboden übertragen, um das Filtrat dieses Substrates nach 16stündiger Bebrütung auf seine letale Eigenschaft gegenüber 18 gr schweren Mäusen nach intravenöser Injektion zu testen. Folgende flüssige Nährsubstrate wurden verwendet:

1. Le-Le-Bouillon nach Tarozzi
2. Pope-Bouillon nach Kahlfeld
3. Glucose-Pepton-Bouillon II (GPB II)
   (2% Pepton-Merck, 2% Casein-Hydrolysat, 0,5% Glucose, Herz- und Leberstückchen)

Die Einbeziehung der Pope- und Glucose-Pepton-Bouillon geschah lediglich zu dem Zweck, optimale Bedingungen für die Toxinproduktion zu schaffen.

Die Filtration der 16stündigen Kulturen wurde stets mit Seitz-Filtern bei geringem Unterdruck mittels Wasserstrahlpumpe vorgenommen.

Als Versuchstiere dienten im Institut gezüchtete Albinomäuse des Stammes NMRI. Die Tiere waren frei von irgendwelchen Krankheitserscheinungen. Bei älteren Mäusen traten lediglich die für diesen Stamm charakteristischen Polyome besonders bei den weiblichen Tieren am Gesäuge auf, wodurch die eigenen Versuche nicht beeinflußt wurden, da zu den Toxintestungen nur junge Mäuse mit einem Gewicht von 18 gr verwendet wurden.

Die Mäuse wurden in ein rechteckiges Holzkästchen, wie es für den Transport von Blutröhrchen benutzt wird, mit dem Kopf in Richtung auf die fest verschlossene hintere Seite gesperrt. An der vorderen Verschlußklappe befand sich am unteren Rand ein Ausschnitt, durch den der Schwanz aus dem Kästchen herausgehalten wurde. Nach Erweiterung der Schwanzvenen durch Beklopfen oder Abreiben gelang die intravenöse Injektion, wenn eine 1-ml-Spritze mit einer Kanüle "CRO-NI" 0,25 x 19 mm benutzt wurde. 0,4, 0,3, 0,2 und 0,1 ml Filtratmenge der einzelnen Stämme wurden an je 4 Mäusen getestet. Wirkte eine dieser Mengen tödlich, wurde der Versuch wiederholt, um Zwischenwerte zu ermitteln. Eine toxische Wirkung des Filtrates wurde dann angenommen, wenn von den 4 Mäusen 3 innerhalb von 24 Stunden p.i. verendet waren. Starben nur ein oder zwei Mäuse, wurde der Versuch wiederholt. Stimmten die letalen Mengen beim ersten und zweiten Versuch nicht überein, wurden bei einem Wiederholungsversuch nur diejenigen Mengen gewertet, die den Tod von 3 oder 4 Mäusen herbeiführten. Ergab der Wiederholungsversuch keine letale Wirkung wie im ersten Versuch, wurde der Stamm als nicht toxisch gewertet.

b) Testung der Toxine im Mäuseletaltest nach Trypsinbehandlung

Als nächster wichtiger Schritt bei der Stammdifferenzierung folgte die Trypsinbehandlung der Kulturfiltrate, wie sie von OAKLEY (35), ROBERTS (41) und VAN HEYNINGEN (47) zur Unterscheidung von β- und ε-Toxin empfohlen worden ist. Die GPB II-Kulturen wurden wie vorher 16 Stunden bebrütet und das Filtrat wie üblich gewonnen. Den Filtraten wurde dann 5 gr% Trypsin-Merck zugesetzt. Nach Durchschütteln schloß sich eine Bebrütung bei 37°C 30 Minuten und eine Aufbewahrung bei Zimmertemperatur 15 Minuten lang an. Das Trypsin löste sich während dieser Zeit durchweg gut auf, wenn beim Hantieren mit den Röhrchen ab und zu leicht geschüttelt wurde. Jedes trypsinhaltige Filtrat wurde an je 4 Mäuse in Mengen von 0,3, 0,2 und 0,1 ml i.v. injiziert. Durch Wiederholungsversuche wurden Zwischenwerte der Dlm ermittelt. Bei jeder Versuchsanordnung wurden 2 Mäuse mit 0,3 ml einer sterilen GPB II, die 5 gr% Trypsin enthielt, als Leerkontrollen inokuliert.

c) Prüfung der Toxine im Neutralisationstest mit Typseren

Als drittes Verfahren für die Differenzierung isolierter Cl. welchii-Stämme wurde der Neutralisationstest mit typenspezifischen Seren durchgeführt. Mit Typ-Stämmen, die uns von der Firma Burrays Wellcome u. C., London, geliefert worden waren, wurden Kaninchen hochimmunisiert. Die Antiseren wurden nach Entblutung der Kaninchen mit o,5% Phenol konserviert und in einer Gefriertruhe bei -24°C in Erlmeyer-Kolben aufbewahrt. Die Aufbewahrungszeit schwankte zwischen 2-6 Monaten. Wie andere Versuche ergeben hatten, waren die Antiseren zur Durchführung des Neutralisationstestes voll geeignet. Es handelte sich um Antiseren der Typen A, B, C, D und F. Vom Typ E stand ein Antiserum leider nicht zur Verfügung.

Für den Neutralisationstest wurde von den isolierten Stämmen das Toxin durch 16stündiges Bebrüten beimpfter GPB II und Filtration durch Seitz-Filter gewonnen und sofort an Mäuse intravenös in verschiedenen Mengen appliziert, um die Dlm zu bestimmen. Dabei wurde das Toxinfiltrat mit physiologischer Kochsalzlösung in folgender Weise verdünnt:

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5
Filtrat (ml)	1	1	1	1	1
NaCl (ml)		1	0,5	0,4	0,3	0,2

Mit der Gesamtmenge der Filtratverdünnung wurden 3-4 Mäuse geimpft, wobei die Menge pro Maus 0,3 ml betrug. Für die Neutralisation wurden Filtratverdünnungen wie vorher verwendet, nur wurde die Verdünnung nicht mit NaCl sondern mit Antiserum der verschiedenen Stämme hergestellt.

Obwohl der nach obigem Schema durchgeführte Vorversuch mit abgestuften Filtrat-NaCl-Verdünnungen schon als Kontrollversuch gewertet werden konnte, wurde bei jedem Neutralisationstest

eines einzelnen Toxinfiltrates noch ein Kontrollversuch an zwei Mäusen durchgeführt, wobei die Mäuse mit der als Dlm ermittelten Filtrat-NaCl-Verdunnung i.v. gespritzt wurden.

Für die Neutralisation des Toxinfiltrates mit fallenden Antiserummengen wurde eine Zeit von 15 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei Zimmertemperatur zugrunde gelegt.

Eine Sonderbehandlung erfuhren diejenigen Cl.welchii-Stämme, deren Toxin sich nach den Versuchsergebnissen der zweiten Stufe (Abschnitt "b") durch 5 gr% Trypsin aktivieren ließ. Bei diesen Stämmen wurde den frisch gewonnenen Filtraten 5 gr% Trypsin in Pulverform zugesetzt. Das Toxin-Trypsin-Gemisch blieb dann 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wurde das Toxin in gleicher Weise wie vorher mit NaCl verdünnt, um zunächst die Dlm zu bestimmen. Später wurde als Verdünnungsmittel Antiserum verwendet und der Neutralisationstest in gleicher Weise wie bei nicht mit Trypsin behandelten Toxinfiltraten durchgeführt.

Das angewandte Verfahren der Neutralisation hat sich bewährt. Es ließ erkennen, welche Dosis des Antiserums ausreichte, um eine Neutralisation des Toxins herbeizuführen. OAKLEY (35) arbeitete bei der Routineuntersuchung mit einem gleichbleibenden Gemisch von 1 ml Filtrat und 0,5 ml Antitoxin, einer Arbeitsdosis, die bei meiner Abstufung der Antiserummengen ebenfalls verwendet wurde. ROBERTS (41) schlägt ein Verhältnis von 0,9 ml Filtrat zu 0,3 ml Antitoxin vor. Mit diesen Größenordnungen konnte die Prüfung meiner Stämme im Neutralisationstest nicht durchgefuhrt werden, da die Dlm meiner Stämme oft unter 0,3 ml lag.

Wie die regelmäßig durchgeführte Prufung der Kulturfiltrate auf pH-Wert ergab, waren die pH-Werte in keinem Fall unter pH 6,5 abgesunken. Sie betrugen im Durchschnitt pH 6,6-6,8. Demzufolge konnte auf eine Pufferung der Toxinfiltrate mit Phosphat oder Borat verzichtet werden.

D. Ergebnisse

a) Untersuchung von Schafen aus Schafhaltungen

Aus Kotproben von 71 Schafen aus 5 Schafhaltungen wurden bei viermaligen Untersuchungen im Januar, Mai, Juli und Oktober 16 Cl.welchii-Stämme isoliert. Die Verteilung dieser Stämme auf die Schafe der einzelnen Bestände ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3 Übersicht über die Bestände, in denen Cl.welchii bei Schafen festgestellt wurde und die Bezeichnung der Stämme

Bestand Nr.	Anzahl der isolierten Cl.welchii-Stämme	Bezeichnung der Cl.welchii-Stämme
1	0	
2	3	TZ_2,BL,ML
3	7	54,70,106,111, 701,813,2416
4	2	474,RX
5	4	2BT,3CT,7GT,11KT
insges.	16	

Die Untersuchung der 16 Stämme mit dem Mauseletalitätstest mit Kulturfiltraten, die von Le-Le-Bouillon hergestellt worden waren, ergab, daß 12 Stämme toxisch waren und 4 Stämme (54, 70, 111 und 2416) sich atoxisch verhielten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 unter Berücksichtigung der in Tabelle 3 benutzten Stammbezeichnungen zusammengestellt.

Die Abhangigkeit von Toxinmenge und Zeitdauer bis zum Tod der Mäuse ist in Tabelle 4 erkennbar. Es ließ sich zwischen starken und schwachen Toxinbildnern unterscheiden.

Tabelle 4 Ergebnisse des Mäuseletaltestes mit Kulturfiltraten der Bestandsstämme von Cl.welchii, die mit Le-Le-Bouillon hergestellt waren

Bestand Nr.	Stammbezeichnung	Dlm (ml)	Zeit bis zum Tod der Mäuse
2	TZ_2	0,25	20 Min.
	BL,ML	0,4	20 Std.
3	701	0,2	10 Min.
	813	0,25	20 Min.
	106	0,35	5 Std.
	54,70,111,2416	-	-
4	474	0,2	10 Min.
	RX	0,25	20 Min.
5	2BT	0,25	20 Min.
	7GT	0,35	5 Std.
	3CT	0,4	10 Std.
	11KT	0,4	20 Std.

Die Prüfung der Toxine im Mäuseletaltest wurde mit Pope-Bouillon-Kulturfiltraten wiederholt. Bei den 12 Stämmen waren die Ergebnisse der Testung die gleichen. Von den 4 bei Le-Le-Bouillon-Kulturfiltraten als atoxisch gefundenen Stämmen kam es jedoch bei dem Stamm 2416 zum Nachweis einer toxischen Wirkung bei 0,3 ml innerhalb von 15 Minuten. Die Stämme 54, 70 und 111 riefen auch bei Verwendung von Pope-Bouillon bei den Mäusen keinen toxischen Effekt hervor.

Ein dritter Versuch mit GPB II ergab hinsichtlich der toxischen Eigenschaften aller Stämme bessere Ergebnisse (s. Tabelle 5).

Der Stamm 70 rief mit 0,06 ml und der Stamm 111 mit 0,25 ml Kulturfiltrat aus GPB II eine toxische Wirkung hervor. Der Stamm 54 blieb auch bei diesem Nährsubstrat atoxisch.

Es sei bemerkt, daß zu diesem Versuch bei jeder Dosis 4 Versuchsmäuse benutzt wurden und als Dlm die Dosis angegeben wurde, die in etwa gleicher Zeit alle 4 Mäuse tötete.

Tabelle 5 Mäuseletalitätstest bei 16 Cl.welchii-Stämmen von Schafen aus Beständen mit Toxinfiltraten aus GPB II

Bestand Nr.	Stamm	Dlm (ml)	Zeit bis zum Verenden der Mäuse
2	TZ 2	0,06	1 Std.
	BL,ML	0,25	10 Std.
3	701,106	0,01	5 Min.
	70,813,2416	0,05-0,07	1 Std.
	111	0,25	10 Std.
	54	-	-
4	474	0,01	5 Min.
	RX	0,06	1 Std.
5	2BT	0,07	1 Std.
	7GT	0,2	2 Std.
	3CT	0,1	6 Std.
	11KT	0,25	10 Std.

Zur Unterscheidung von β - und ε -Toxin folgten nunmehr die Behandlung von GPB II-Toxinfiltraten der einzelnen Stämme mit 5 gr% Trypsin und die Testung dieser Filtrate im Mäuseletalitätstest.

Tabelle 6 Übersicht über die Wirkung von 5gr% Trypsin zu Toxinfiltraten aus GPB II bei 16 Cl.welchii-Stämmen

e-and	Stamm	Dlm (ml) mit Trypsin	Dlm (ml) ohne Trypsin	Letalzeit mit Trypsin	Letalzeit ohne Trypsin	Trypsin aktiviert	Trypsin inaktiviert	indifferent
2	TZ_2	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
	BL,ML	0,3	0,2	11 Std.	10 Std.	nein	nein	ja
	106, 701	-	0,01	-	5 Min.	nein	ja	nein
	813, 2416	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
3	70	0,02	0,06	1 Std.	1 Std.	ja	nein	nein
	111	0,3	0,2	12 Std.	10 Std.	nein	nein	ja
	54	-	-	-	-	nein	nein	nein
	474	-	0,01	-	5 Min.	nein	ja	nein
4	RX	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
	2BT	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
5	3CT, 7GT	0,2	0,1	5 Std.	5 Std.	nein	nein	ja
	11KT	0,3	0,2	12 Std.	10 Std.	nein	nein	ja

Nach den Ergebnissen der mit Trypsin behandelten Kulturfiltrate können die Stämme TZ_2, 70, 813, 2416, RX und 2BT als Typ D und die Stämme 106, 701 und 474 als Typ B differenziert werden. Nicht möglich war eine Differenzierung bei den Stämmen BL, ML, 111, 3CT, 7GT und 11KT und bei dem Stamm 54, der keine im Letalitätstest nachweisbaren Toxine bildete.

Als weiteres Verfahren zur Differenzierung der Cl.welchii-Stämme, die aus dem Kot von Bestandsschafen isoliert worden waren, wurde der Neutralisationstest angewendet. Hierbei wurden nicht nur die bei der Trypsinbehandlung der Kulturfiltrate indifferenten Stämme geprüft, sondern auch die Stämme, deren Typ bereits festgestellt worden war. Als Nährboden für die Kulturfil-

tratgewinnung diente GPB II. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Differenzierung der Cl.welchii-Stämme der Bestandsschafe mit dem Neutralisationstest unter Verwendung von Toxinfiltraten aus GPB II

Bestand	Stamm-bezeichnung	Dlm (ml)	neutralisiert mit Typserum: A	B	C	D	F	Stamm-typ
2	TZ_2	0,06	-	-	-	+	-	D
	BL,ML	0,25	-	-	+	-	-	C
3	106,701	0,01	-	+	-	-	-	B
	813,2416	0,05	-	-	-	+	-	D
	70	0,06	-	-	-	+	-	D
	111	0,2	-	-	+	-	-	C
	54	-	-	-	-	-	-	?
4	474	0,01	-	+	-	-	-	B
	RX	0,06	-	-	-	+	-	D
5	2BT	0,07	-	-	-	+	-	D
	3CT,7GT	0,1-0,2	-	+	-	-	-	B
	11KT	0,25	-	-	+	-	-	C
insgesamt:			0	5	4	6	0	

+ = neutralisiert; - = nicht neutralisiert

Im Bestand 2 wurden ein D-Stamm und 2 C-Stämme ermittelt.

Im Bestand 3 wurden 2 B-Stämme, 1 C-Stamm und 3 D-Stämme festgestellt. Ein Stamm war nicht differenzierbar.

Im Bestand 4 kamen ein B- und ein D-Stamm vor.

Im Bestand 5 wurden 2 B-Stämme und je ein C- und ein D-Stamm ermittelt.

Um zu erfahren, ob die Schafe in ihrem Kot bestimmte Stämme nur an einem Entnahmetermin aufwiesen, oder den gleichen Stamm auch zu anderen Entnahmeterminen ausschieden, wurden die Kotprobenentnahmen bei den 71 Bestandsschafen dreimal, und zwar im Mai, Juli und Oktober 1964 wiederholt und die Kotproben in gleicher Weise wie vorher auf das Vorkommen von Cl.welchii geprüft und die Stämme bei positivem Nachweis in ihrem Typ bestimmt.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Untersuchungen. In der Tabelle sind die isolierten Cl.welchii-Stämme nur unter Berücksichtigung der Stammbezeichnungen, wie sie in Tabelle 3 enthalten sind, nicht aber die Stammtypen aufgeführt.

Tabelle 8 Ergebnisse der Untersuchungen von 71 Bestandsschafen in den 4 Untersuchungsmonaten auf Cl.welchii

Bestand	Januar	Mai	Juli	Oktober
1	-	-	-	-
2	TZ_2,BL,ML	TZ_2,BL,ML	TZ_2,BL,ML	TZ_2,BL,ML
3	54,106,701, 813,2416	54,<u>7Q</u>,106, <u>111</u>,701, 813,2416	54,<u>7Q</u>,106, <u>111</u>,701, 813,2416	54,106,701 813,2416
4	474,RX	474,RX	474,RX	474,RX
5	2BT	2BT,<u>3CT</u>	2BT,<u>7GT</u>, <u>11KT</u>	-
insgesamt	11	14	15	10

Es bedeuten: unterstrichene Zahlen = sporadisch auftretende Stämme

Im Bestand 1 konnte bei keinem der insgesamt 6 Schafe bei den 4 Untersuchungen Cl.welchii im Kot festgestellt werden.

Im Bestand 2 wurden bei 3 gleichen Schafen im Januar, Mai, Juli und Oktober die gleichen Cl.welchii-Stämme im Kot ermittelt.

Im Bestand 3 wurde im Januar, Mai, Juli und Oktober bei 5 gleichen Schafen Cl.welchii aus dem Kot isoliert. Bei zwei weiteren Schafen wurde im Mai und Juli Cl.welchii festgestellt. Im Kot beider Schafe waren diese Stämme im Januar und Oktober nicht nachweisbar.

Im Bestand 4 wurden im Kot von 2 gleichen Schafen bei allen 4 Untersuchungsterminen 2 Cl.welchii-Stämme ermittelt.

Im Bestand 5 konnte im Kot eines Schafes im Januar, Mai und Juli Cl.welchii festgestellt werden. Im Mai wurde bei einem weiteren Schaf ein Cl.welchii-Stamm und im Juli wurden bei zwei weiteren Schafen 2 Cl.welchii-Stämme isoliert.

Die Ergebnisse der Stammdifferenzierung bei den einzelnen Untersuchungsterminen sind in Tabelle 9 dargestellt, wobei die gleichen Bezeichnungen wie in Tabelle 3 für die Stämme und Schafe zugrundegelegt und nach Typen geordnet wurden.

Tabelle 9 Verteilung der Stammtypen des Cl.welchii auf die Schafe aus 5 verschiedenen Beständen

Typ	A	B	C	D	nicht bestimmbar
Bestand 1	-	-	-	-	-
Bestand 2	-	-	BL, ML	TZ_2	-
Bestand 3	-	106, 107	111	70, 813, 2416	54
Bestand 4	-	474	-	RX	-
Bestand 5	-	3CT, 7GT	11KT	2BT	-
insgesamt	0	5	4	6	1

Im Bestand 2 wurden sowohl im Januar als auch im Mai, Juli und Oktober bei 4 Schafen der Typ C und bei einem Schaf der Typ D ermittelt.

Im Bestand 3 waren bei je 2 Schafen die Typen B und D dauernde Darmbewohner, während die Typen C und D im Mai und Juli bei je einem Schaf sporadisch auftraten. Ein nicht bestimmbarer Stamm (54) wurde bei einem Schaf bei allen 4 Untersuchungsterminen festgestellt.

Im Bestand 4 kamen die Typen B und D bei je einem Schaf in allen 4 Untersuchungsmonaten vor.

Im Bestand 5 war der Typ D ein regelmäßiger Darmbewohner bei einem Schaf im Januar, Mai und Juli. Der Typ B wurde bei je einem Schaf im Mai und Juli und der Typ C bei einem Schaf im Juli ermittelt.

b) Vorkommen von Cl.welchii im Darm von Schlachtschafen

250 Darminhaltsproben aus 4 verschiedenen Darmabschnitten von 100 Schlachtschafen wurden auf das Vorkommen von Cl.welchii untersucht. Insgesamt konnten 20 Cl.welchii-Stämme isoliert werden. Davon wurden nur 2 Stämme in Darmabschnitten von 2 gleichen Schafen ermittelt, nämlich der Stamm 11C und 11CO aus Caecum und Colon ascendens von einem Schaf und der Stamm 12IL und 12C aus Ileum und Caecum eines anderen Schafes. Die Verteilung der Stämme auf die einzelnen Darmabschnitte ist aus Tabelle 10 zu ersehen.

Tabelle 10 Zahl der Cl.welchii-Stämme und Bezeichnungen nach den Darmabschnitten, aus denen die Stämme isoliert wurden

Darmabschnitt	Anzahl der isolierten Cl.welchii-Stämme	Bezeichnung der Cl.welchii-Stämme
Jejunum	0	-
Ileum	1	12IL
Caecum	5	7C, 11C, 12C, 33C, 36C
Colon ascendens	5	10CO, 11CO, 13CO, 20CO, 24CO
Dickdarm	9	1D, 3D, 15D, 19D, 21D, 24D, 29D, 30D, 44D
insgesamt	20	

Es bedeuten: unterstrichene Zahlen = die Stämme wurden von denselben Schafen aus verschiedenen Darmabschnitten isoliert

Die Untersuchung der 20 Cl.welchii-Stämme mit dem Mäuseletalitätstest aus Kulturfiltraten von Le-Le-Bouillon ergab, daß 17 Stämme toxisch waren. 3 Stämme (36C,10CO und 29D) bildeten keine testbaren Toxinmengen (s.Tabelle 11).

Tabelle 11 Mäuseletalitätstest bei 20 Cl.welchii-Stämmen aus verschiedenen Darmabschnitten von Schlachtschafen mit Toxinfiltraten aus Le-Le-Bouillon

Darmabschnitt	Stammbezeichnung	Dlm (ml)	Zeit bis zum Verenden der Mäuse
Ileum	12IL	0,4	11 Std.
Caecum	7C	o,25	20 Min.
	11C	0,4	10 Std.
	12C	0,4	20 Std.
	33C	0,4	8 Std.
	36C	-	-
Colon ascendens	10CO	-	-
	11CO,24CO	0,25	20 Min.
	13CO	0,3	2 Std.
	20CO	0,4	10 Std.
Dickdarm	3D	0,2	20 Min.
	19D	0,25	20 Min.
	1D,21D	0,4	5 Std.
	24D	0,4	5 Std.
	29D	-	-
	15D,30D	0,3	4 Std.
	44D	0,2	10 Min.

Die Prüfung der Toxine im Mäuseletalitätstest wurde mit Pope-Bouillon wiederholt. Die Ergebnisse waren die gleichen wie bei der Le-Le-Bouillon.

Ein dritter Versuch zur Feststellung der Toxinwirkung wurde mit GPB II durchgeführt (s.Tabelle 12). Zu diesem Versuch wurden wieder 4 Mäuse mit Kulturfiltrat von jedem Stamm geimpft. Die Dlm war bei allen 17 Stämme höher als bei den vorher verwendeten Nährsubstraten. Die 3 Stämme 36C, 10CO und 29D blieben auch bei Kultivierung in GPB II atoxisch.

Tabelle 12 Wirkung der Toxinfiltrate aus GPB II von 20 Cl.welchii-Stämmen aus Darmabschnitten von Schlachtschafen im Mäuseletalitätstest

Darm-abschnitt	Stamm-bezeichnung	Dlm (ml)	Zeit bis zum Verenden der Mäuse
Ileum	12IL	0,1	5 Std.
Caecum	7C	0,05	1 Std.
	11C	0,25	8 Std.
	12C	0,1	6 Std.
	33C	0,2	3 Std.
	36C	-	-
Colon ascendens	10CO	-	-
	11CO,24CO	0,05	1 Std.
	13CO	0,3	3 Std.
	20CO	0,1	6 Std.
Dickdarm	1D,21D,24D	0,1	3 Std.
	3D,19D	0,06	30 Min.
	15D,30D	0,2	2 Std.
	29D	-	-
	44D	0,01	5 Min.

Es folgte die Behandlung der GPB II-Toxinfiltrate mit 5 gr% Trypsin, um die β - und ε -Toxine zu unterscheiden. Die Testung der Kulturfiltrate wurde im Mäuseversuch durchgeführt (s. Tabelle 13).

Tabelle 13 Übersicht über die Wirkung von 5 gr% Trypsin zu Toxinfiltraten aus GPB II von 20 Cl.welchii-Stämmen

Darmabschnitt	Stamm	Dlm (ml) mit Trypsin	Dlm (ml) ohne Trypsin	Letalzeit mit Trypsin	Letalzeit ohne Trypsin	Trypsin aktiviert	Trypsin inaktiviert	indifferent
Ileum	12IL	0,3	0,1	7 Std.	5 Std.	nein	ja	nein
Caecum	7C	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
	11C	0,1	0,3	4 Std.	8 Std.	ja	nein	nein
	12C	0,2	0,1	5 Std.	6 Std.	nein	nein	ja
	33C	-	0,2	-	3 Std.	nein	ja	nein
	36C	-	-	-	-	-	-	-
Colon asc.	10CO	-	-	-	-	-	-	-
	11CO, 24CO	0,02	0,06	10 Min.	1 Std.	ja	nein	nein
	13CO	-	0,2	-	2 Std.	nein	ja	nein
	20CO	0,2	0,1	6 Std.	6 Std.	nein	nein	ja
Dickdarm	1D, 21D	-	0,1	-	3 Std.	nein	ja	nein
	3D, 19D	0,02	0,06	10 Min.	30 Min.	ja	nein	nein
	15D, 30D	0,2	0,2	3 Std.	2 Std.	nein	nein	ja
	24D	0,3	0,1	5 Std.	3 Std.	nein	ja	nein
	29D	-	-	-	-	-	-	-
	44D	-	0,01	-	5 Min.	nein	ja	nein

Nach den Ergebnissen der mit Trypsin behandelten Kulturfiltrate handelt es sich bei den Stämmen 7C, 11C, 11CO, 24CO, 3D und 19D um D-Stämme und bei den Stämmen 12IL, 33C, 13CO, 1D, 21D, 24D und 44D um B-Stämme. Die 4 Stämme 12C, 20CO,15D und 30D verhielten sich indifferent, da die Dlm mit und ohne Trypsinbehandlung etwa die gleiche war. Die drei als atoxisch bezeichneten

Stämme 36C, 10CO und 29D blieben auch nach Trypsinbehandlung ntoxisch.

Nunmehr wurden die 20 Stämme dem Neutralisationstest in der glei-nen Weise wie bei den Stämmen der Bestandsschafe unterworfen. als Toxinfiltrate dienten Filtrate einer 16stündigen GPB II-Kul-tur. Die Ergebnisse des Neutralisationstestes sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14 Differenzierung der Cl.welchii-Stämme aus dem Darminhalt von Schlachtschafen mit dem Neutralisationstest unter Verwendung von Toxinfiltraten aus GPB II

Darmabschnitt	Stammbezeichnung	Dlm (ml)	Neutralisiert mit Typserum: A	B	C	D	F	Stammtyp
Ileum	12IL	0,1	-	+	-	-	-	B
Caecum	7C	0,05	-	-	-	+	-	D
	11C	0,25	-	-	-	+	-	D
	12C,33C	0,1-0,2	-	+	-	-	-	B
	36C	-	-	-	-	-	-	?
Colon asc.	11CO,24CO	0,05	-	-	-	+	-	D
	13CO,20CO	0,1-0,3	-	+	-	-	-	B
	10CO	-	-	-	-	-	-	?
Dickdarm	15D,30D	0,2	+	-	-	-	-	A
	1D,21D,24D	0,1	-	+	-	-	-	B
	3D,19D	0,06	-	-	-	+	-	D
	44D	0,01	-	+	-	-	-	B
	29D	-	-	-	-	-	-	?

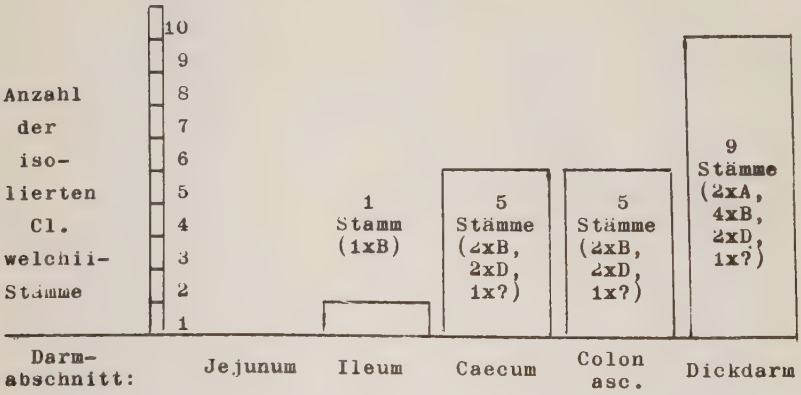
+ = neutralisiert; - = nicht neutralisiert

Durch den Neutralisationstest ließen sich die Stämme 12IL, 12C, 33C, 13CO, 20CO, 1D, 21D, 24D und 44D zweifelsfrei als B-, die Stämme 7C, 11C, 11CO, 24CO, 3D und 19D als D- und die Stämme

15D und 30D als A-Typen differenzieren. Die drei atoxischen Stämme 36C, 10CO und 29D konnten in ihrem Typ nicht bestimmt werden.

Über die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Typ-Stämme in den verschiedenen Darmabschnitten gibt die graphische Darstellung 1 Aufschluß. Mit"Dickdarm" sind die Darminhaltsproben bezeichnet, die aus Caecum und Colon ascendens entnommen und zu einer Probe vereinigt wurden.

Darstellung 1 Verteilung der isolierten Cl.welchii-Stämme aus Darmabschnitten von Schlachtschafen



Bemerkenswert ist, daß bei Untersuchungen von 50 Schlachtschafen in keinem Fall Cl.welchii im Jejunum festgestellt wurde. Im Ileum lag nur einmal ein B-Stamm bei einem Schaf vor. Im Caecum und Colon ascendens wurden je 5 Stämme festgestellt und zwar je 2 B-, 2D- und ein unbestimmbarer Stamm. Die Untersuchung von Dickdarmproben ergab in 9 Fällen Cl.welchii-Stämme (2A-, 4B-, 2D und ein nicht differenzierbarer Stamm).

E. Besprechung

In Kotproben von 71 Schafen aus 5 Beständen wurden 16 Cl.welchii-Stämme (=22,5%) festgestellt.

In 4 verschiedenen Darmabschnitten von 100 klinisch gesunden Schlachtschafen konnten 20 Cl.welchii-Stämme (20%) ermittelt werden.

Ein Vergleich dieser Zahlen mit Untersuchungsergebnissen anderer Autoren ist nicht möglich. Doch dürfte die Annahme berechtigt sein, daß Cl.welchii relativ häufig im Darm gesunder Schafe vorkommt.

Je nach Art des Bestandes, der Fütterung und der hygienischen Bedingungen ist mit Schwankungen in der Häufigkeit, die nach BERGMANN (5) bis zu 50% betragen kann, zu rechnen. Die Schafe in den untersuchten 5 Beständen ließen das durchaus erkennen, denn in einem Bestand wurde Cl.welchii zu keiner Zeit im Kot der Schafe gefunden, während in einem anderen Bestand dieser Keim wiederholt im Kot vorkam. Die Schafe wurden in letzterem Bestand eng gehalten und dienten zu Experimenten mit Parasiten. Nach BEHRENS (4) sollen Cl.welchii-Infektionen bei Schafen, die von Wurmparasiten befallen sind, häufiger vorkommen.

Die bei den Bestandsschafen festgestellten 16 Stämme verteilen sich auf 6D-, 5B- und 4C-Typen des Cl.welchii. Ein Stamm konnte nicht differenziert werden.

B- und D-Stämme wurden bei klinisch gesunden Schafen von BULLEN (8), HEPPLE (24) und MONTGOMERIE (34) ebenfalls oft festgestellt. Die gleichen Typen fanden BEHRENS (4), MITSCHERLICH (32,33) und FRANK (14) in Körperorganen kranker und gestorbener Schafe.

Der Typ C wurde bei 4 Schafen in 3 Beständen ermittelt und kommt demnach auch bei gesunden Schafen vor. DEDIE, SCHEIBNER

und PREUß (11) fanden diesen Typ 1954 bei 40 kranken Schafen.

Die Typen A, C und D wurden von TOMOV und Mitarbeitern (45) bei gesunden Lämmern und Schafen festgestellt. Die Häufigkeit des Types C wird als gering bezeichnet. Den Typ D isolierten TOMOV und Mitarbeiter zu 3,8% aus der Leber und zu 6,5% aus dem Dünndarm gesunder Lämmer.

Bakteriologische Kotuntersuchungen, die sich auf 4 verschiedene Termine des Jahres 1964 erstreckten, ergaben, daß 10 Stämme bei den gleichen Schafen in jeder Jahreszeit wieder ermittelt werden konnten. Bei 6 Schafen traten Cl.welchii-Stämme sporadisch auf.

Bei 10 klinisch gesunden Lämmern im Alter bis zu 3 Monaten, die in 4 Beständen standen, wurden im Kot in keinem Fall Cl.welchii-Stämme nachgewiesen. In einem Bestand, in dem sich 2 Lämmer befanden, wurde allerdings auch bei den älteren Schafen Cl.welchii nicht festgestellt.

GRINER (16), der sich in seinen Untersuchungen auf die Ermittlung des Types D beschränkte, gibt an, daß 67,2% der untersuchten Lämmer noch nicht mit dem Cl.welchii Typ D in Kontakt gekommen waren. GRINER kam zu dieser Feststellung durch Untersuchungen des Blutserums auf Antitoxine, wobei er einen Antitoxintiter als Beweis für eine latente Infektion ansah. Nach BULLEN und BATTEY (9) sollen bei Schafen, die Träger von Cl. welchii sind, ständig geringe Mengen von Toxin vom Darm resorbiert werden und Antikörperbildung hervorrufen.

Eine Zahl der ermittelten Stämme zeigte im Mäuseletaltest eine hohe Toxizität. Die Toxizität der Stämme ist daher kein Beweis für ihre Pathogenität, denn die Schafe, bei denen die stark toxisch wirkenden Stämme nachgewiesen wurden, waren klinisch völlig gesund. Die Theorie von EVANS (12), daß in-vitro stark toxisch wirkende Stämme generell als Krankheitserreger zu gelten haben, konnte bei unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. BALDWIN's (2) Ansicht, daß saprophytische Cl.welchii-Keime im Darm keine Toxine bilden, dürfte ebenfalls nicht

haltbar sein. Wir konnten ähnlich wie WILDFÜHR (50) nicht den Beweis dafür erbringen, daß atoxische Welchii-Stämme durch Kultivierung auf protein- und kohlenhydratreichen Nährböden zu toxischen Stämmen umgewandelt werden können, denn alle Versuche, die Toxinbildung bei atoxischen Stämmen zu provozieren, schlugen fehl. ROBERTSON und KEPPIE (42) ist daher darin zuzustimmen, daß die Dlm der Cl.welchii-Stämme nicht ausschlaggebend für die krankmachende Wirkung der Stämme sein kann.

Offenbar sind für die pathogene Wirkung des Cl.welchii bestimmte Faktoren, die die Vermehrungsfähigkeit der Keime einerseits erhöhen und die Resistenz der Schafe andererseits verringern, notwendig, um durch Cl.welchii Krankheiten entstehen zu lassen. Solche Faktoren dürften sein: mastige oder eiweißreiche Ernährung, Änderung des Futters, Störungen der Peristaltik des Darmes, Darmentzündungen und Mangel an Rauhfutter.

Die bei 100 klinisch gesunden Schlachtschafen aus dem Inhalt verschiedener Darmabschnitte ermittelten Cl.welchii-Stämme wurden fast ausschließlich im Caecum und Colon ascendens gefunden. Ein Stamm wurde aus dem Ileum isoliert. Das Jejunum war stets frei von Cl.welchii-Keimen. Bei den 20 Stämmen handelte es sich um 2 A-, 9 B- und 6 D-Typ-Stämme. Drei Stämme konnten nicht differenziert werden. BULLEN (8) untersuchte 100 Schlachtschafe auf das Vorkommen von Cl.welchii Typ D. In 12 Fällen konnte er den Typ D nachweisen.

Klinisch gesunde Schafe enthalten nach unseren Untersuchungen an 100 Schlachtschafen im Caecum und Colon ascendens am häufigsten Cl.welchii. WERNER und SEELIGER (48) fanden beim Menschen Magen und Dünndarm keimfrei, während im Dickdarm eine konstante Flora ähnlich der der Faeces gefunden wurde. HERRMANN (25) stellte bei Menschen im Dickdarm 35% grampositive, anaerobe Stäbchen fest, bei denen es sich in 8% um verschiedene Clostridien-Arten handelte.

Auffallend ist, daß bei den Schlachtschafen nur je 2 Stämme im Caecum und Colon ascendens bzw. Ileum und Caecum bei zwei glei-

chen Schafen nachgewiesen wurden. In allen anderen Fällen konnten die Stämme entweder nur im Caecum oder nur im Colon ascendens ermittelt werden. Man sollte annehmen, daß bei einem Nachweis eines Cl.welchii-Stammes im Caecum der gleiche Nachweis auch im Colon ascendens erbracht werden müßte. Dies war jedoch nicht der Fall und scheint uns die Problematik der Untersuchungen von Darminhalt auf Cl.welchii zu beweisen. Bei der großen Menge des vorhandenen Darminhaltes und der geringen Menge des Materials, das schließlich auf der Traubenzucker-Blut-Agar-Platte ausgestrichen wird, stellt der Nachweis von Cl.welchii wohl doch nur ein Zufallsergebnis dar. Es kommt hinzu, daß sich bei dichterem Wachstum leicht Cl.welchii-Kolonien der Isolierung entziehen können, weil ihre Merkmale durch andere Kolonien verdeckt werden. Trotz dieses Unsicherheitsfaktors der Untersuchungsmethodik ist uns aber klar geworden, daß die Zahl der Cl.welchii-Keime im Darm gesunder Schafe gering sein dürfte und hierin ein wesentlicher Unterschied zwischen gesunden und infolge Welchii-Infektion erkrankten Schafen bestehen dürfte. Leider ist bei gestorbenen Schafen oft mit einer erheblichen Beeinflussung der bakteriologischen Diagnose durch postmortale Veränderungen (Fäulnisvorgänge) zu rechnen, so daß in diesen Fällen auch die Zahl der vorhandenen Clostridien diagnostisch nicht zu verwerten ist, weil ohne Rücksicht darauf, ob eine Anaerobier-Infektion vorliegt oder nicht, mit einer postmortalen Vermehrung der Anaerobier im Darm und in den Organen gerechnet werden kann.

Den Weg, den die Clostridien bis zu ihrem Fundort im Dickdarm nehmen, hat bisher kein Autor erforscht. Es ist vorstellbar, daß das Cl.welchii mit der Nahrung aufgenommen wird und durch Bildung von Sporen in der Lage ist, die Magen-Dünndarmschranke zu überwinden, so daß vegetative Formen im Dickdarm entstehen, wo sie dann auch nachweisbar sind.

GRINER und JOHNSON (18) fanden Cl.welchii-Stämme bei Schafen, die infolge Cl.welchii-Infektionen gestorben waren, im Jejunum und Ileum. Der Fundort der Anaerobier könnte demzufolge einen wichtigen diagnostischen Hinweis geben. Doch dürften

hieraus für das Vorliegen einer Enterotoxämie oder Lämmerdysenterie diagnostisch nur Schlußfolgerungen gezogen werden können, wenn die Tiere im frischen Zustand untersucht werden. Auch GRINER und BRACKEN (17) sowie FIELD und GIBSON (13) berichten über das Vorkommen von Cl.welchii-Stämmen im Jejunum und Ileum von Kälbern, die durch Cl.welchii-Infektionen verendet waren.

Für das unterschiedliche Vorkommen von Cl.welchii-Keimen in verschiedenen Darmabschnitten bei gesunden und kranken Schafen ist auch die Verschiebung des pH-Wertes von sauer nach neutral und alkalisch im Jejunum und Ileum verantwortlich gemacht worden. Nach unserer Meinung gibt die pH-Verschiebung keine ausreichende Erklärung, weil der pH-Wert des Jejunums bei gesunden Schafen bei etwa 7,2 liegen kann. Eigene pH-Messungen im Jejunum und Ileum bei 10 Schlachtschafen ergaben Werte von pH 6,8-7,3, die für eine Vermehrung von Cl.welchii durchaus geeignet sind.

Für die Diagnostik der Welchii-Infektionen beim Schaf bleiben nach wie vor Schwierigkeiten bestehen, deren Beseitigung nach unseren Erfahrungen mit dem Frischezustand des zur bakteriologischen Untersuchung vorliegenden Materials steht und fällt. Wie die englischen Autoren der Schule von OAKLEY betonen, soll eine beweiskräftige Diagnose der Welchii-Infektion nur durch den Nachweis der im Darminhalt oder in den Organen im Neutralisationstest feststellbaren Toxine möglich sein. Die Methode läßt die Frage offen, ob der Organismus durch die Toxine geschädigt wurde oder nicht. Sie dürfte weiterhin davon wesentlich abhängen, wie das Untersuchungsmaterial beschaffen ist; denn im Zustand beginnender Fäulnis dürfte es schwierig sein, zwischen Toxinen, die sich bei der postmortalen Vermehrung der Keime gebildet haben oder intravital entstanden sind, zu unterscheiden. Nach DEDIE, SCHEIBNER und PREUß (11) soll außerdem in eingesandten, älteren Darmproben ein Toxinnachweis von Cl.welchii nicht mehr gelingen, eine Tatsache, die dafür spricht, daß die Toxine durch die Fäulnisvorgänge zerstört werden.

Nur durch Reihenuntersuchungen an getöteten gesunden sowie infolge einer Cl.welchii-Infektion verendeten Schafen, die verschieden lange Zeiten nach dem Tode aufbewahrt wurden, wird sich klären lassen, welche Bedeutung dem Nachweis der Welchii-Keime in den verschiedenen Darmabschnitten und Organen, sowie der Zahl der Keime in diesen Teilen, sowie der Toxine im Darm und in den blutreichen Organen zukommt.

E. Zusammenfassung

1. Aus Kotproben von 71 klinisch gesunden Schafen aus 5 Beständen konnten 16 Cl.welchii-Stämme (=22,5%) isoliert werden. Durch Trypsinbehandlung der Kulturfiltrate und Neutralisationsversuche wurden die 16 Stämme differenziert. Es handelte sich um 5 B-, 4 C- und 6 D-Typ-Stämme. Ein Stamm konnte nicht bestimmt werden.

   Die Kotprobenuntersuchungen der Bestandsschafe wurden im Januar, Mai, Juni und Oktober durchgeführt. 10 der 16 Stämme wurden in allen 4 Monaten bei den gleichen Schafen festgestellt. Bei 10 bis zu 3 Monate alten Lämmern, die in 4 Beständen standen, wurden im Kot in keinem Fall Cl.welchii-Stämme nachgewiesen.

2. Bei 100 klinisch gesunden Schlachtschafen wurde aus 4 verschiedenen Darmabschnitten Inhalt entnommen. Daraus konnten 20 Cl.welchii-Stämme (=20%) ermittelt und als 2 A-, 9 B- und 6 D-Typ-Stämme bestimmt werden. Drei Stämme waren atoxisch und deshalb nicht differenzierbar.

   19 der 20 Cl.welchii-Stämme wurden aus dem Dickdarm (Caecum und Colon ascendens) isoliert. Ein Stamm (Typ B) konnte im Ileum festgestellt werden.

3. Insgesamt wurden bei 171 klinisch gesunden Schafen 36 Cl. welchii-Stämme (=21,1%) isoliert. Diese 36 Stämme verteilen sich auf 2 A-, 14 B-, 4 C und 12 D-Typen des Cl.welchii und 4 atoxische Stämme, die nicht differenziert werden konnten.

4. Die Toxizität der Cl.welchii-Stämme kann nicht als Beweis für eine Pathogenität angesehen werden.

5. Die bakteriologische Diagnose einer Cl.welchii-Infektion bleibt nach wie vor schwierig. Ob die Zahl der im Dickdarm nachweisbaren Cl.welchii-Keime oder der Toxinnachweis im Darm oder in den blutreichen Organen eine zuverlässige Grundlage für die Diagnostik bieten können, bedarf noch eingehender Untersuchungen an Schafen, die infolge von Cl.welchii-Infektionen verendeten und verschieden lange Zeit nach dem Tode aufbewahrt wurden.

G. Literaturverzeichnis

1. Adamse, Th.T. Boerrigter, F.G. Dijkstra, R.G. Zandstra, P.
   Clostridium perfringens - infektie bij mestvarkens
   Tschr. diergeneesk, 89, 533, (1964)

2. Baldwin, E.
   Clostridial Enterotoxemia
   Vet.Med. 54, 143, (1959)

3. Barnes, D.M. Moon, H.W.
   Enterotoxemia in pigs due to Clostridium perfringens type C
   J.Amer.Vet.Med.Ass. 144, 1391, (1964)

4. Behrens, H.
   Zur Enterotoxaemie der Schafe
   Dtsch.tierärztl.Wschr. 61, 1, (1954)

5. Bergmann, J.
   Der Fraenkel'sche Gasbazillus (Cl.perfringens) als Seuchenerreger bei Schafen
   Schweiz.Arch.Tierhk. 95, 358, (1953)

6. Bergmann, J. Rapp, G.
   Das serologische Verhalten der Typen des Fraenkel'schen Gasbazillus (Cl. perfringens)
   Zbl.Bakt.I.Orig. 159, 500, (1952/53)

7. Blenden, D.C. Merilan, C.P.
   Isolation of Clostridia by crystal violet inhibition of aerobic sporeformine bacteria
   Amer.J.Vet.Res. 122, 944, (1961)

8. Bullen, J.
   Enterotoxemia of sheep: Clostr.welchii type D in the alimentara tract of normal animals
   J.Path.Bact. 60, 201, (1952)

9. Bullen, J. Battey, I.
   Enterotoxemia of sheep
   Vet.Rec. 69, 1268, (1957)

10. Bühlmann, X. Boller, H.
    Ein Fall von Euterentzündung beim Rind hervorgerufen durch eine Infektion mit Cl.welchii
    Schweiz.Arch.Tierhk. 99, 254, (1957)

11. Dedié, K. Scheibner, G. Preuß, H.
    Zur Enterotoxaemie der Schafe von Typ C in Deutschland
    Arch.exper.Vet.Med. 11, 921, (1957)

12. Evans, D.G.
    The in-vitro production of α-toxin, θ-haemolysin and hyaluronidase by strains of Cl.welchii type A and the relationship of in-vitro properties to virulence in Guinea-pigs
    J.Path.Bact. 57, 75, (1945)

13. Field, H.J.
Gibson, E.A.
Studies on piglet mortality
2. Clostridium welchii-infection
Vet.Rec. 67, 31, (1955)

14. Frank, F.W.
Clostridium perfringens type B from enterotoxemia in young ruminants
Amer.J.Vet.Res. 26, 492, (1965)

15. Gregory, D.W.
Clostridium perfringens type C enterotoxemia in a calf
North Amer.Vet. 37, 195, (1956)

16. Griner, L.A.
Enterotoxemia of sheep
Amer.J.Vet.Res. 22, 429, (1961)

17. Griner, L.A.
Bracken, F.K.
Clostridium perfringens (type C) in acute haemorrhagic of calves
J.Amer.Vet.Med.Ass. 122, 99, (1953)

18. Griner, L.A.
Johnson, H.W.
Clostridium perfringens type C in haemorrhagic enterotoxemia of lambs
J.Amer.Vet.Med.Ass. 125, 125, (1954)

19. Goudie, J.G.
The nature of a neutralizing substance for Clostridium welchii alpha-toxin in faeces
J.Path.Bact. 78, 17, (1959)

20. Gurtürk, S.
Hämagglutinations-Hemmungs-Test
Vet.-med.Habil.-Schrift, Hannover (1952)

21. Hain, E.
Bacillus enterotoxicus (B.welchii Typ F) in den Stuhlen normaler Personen
Zbl.Bakt.I.Orig. 153, 319, (1948/49)

22. Hallmann, L.
Bakteriologie und Serologie
3.Aufl.Thieme, Stuttgart, (1961)

23. Heidrich, H.J.
Grossklaus, D.
Zwei Fälle einer durch Clostridium perfringes verursachten akuten Mastitis beim Rind
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 72, 1,(1959)

24. Hepple, J.R.
Chodnik, K.S.
Price, E.K.
Immunisation of lambs against Clostridium welchii type D enterotoxemia (pulpy kidney disease) with a purified toxoid aluminium treated
Vet.Rec. 71, 201, (1959)

25.Herrmann, W.
Die anaeroben Darmbakterien im Rahmen der Dysbakterie-Frage
Zbl.Bakt.I.Orig. 170, 315, (1957/58)

26. Hinz, K.-H.
Studien uber das Alpha-Toxin von Cl.welchii
Vet.-med.Diss. Berlin FU, (1964)

27. Matthes, S. — Untersuchungen über die Dermotoxine der 6 Clostridium-welchii-Typen am Kaninchen. Zbl.Bakt.I.Orig. 196, 508, (1965)

28. Mc Gowan, B. Moulton, J.E. Rood, S.E. — Lamb losses associated with Clostridium perfringens type A. J.Amer.Vet.Med.Ass. 133, 219, (1958)

29. Meister, A. Sober, H. Tice, S. — Enzymatic decarboxylation of aspratic-acid to d-alanine. J.Biol.Chem. 189, 577, (1951)

30. Meyn, A. Bergmann, J. Endrejat, E. — Über das Vorkommen schafpathogener Typen des Fraenkelschen Gasbazillus in Deutschland. Mhefte prakt.Tierhk. 4, 259, (1952)

31. Mitscherlich, E. Bratke, E. — Enterotoxämie der Schafe. Berl.Münch.tierärztl.Wschr.70,229,(1957)

32. Mitscherlich, E. Gürtürk, S. Köhler, H. — Die Lämmerruhr in Deutschland. Berl.Münch.tierärztl.Wschr.66, 1,(1953)

33. Mitscherlich, E. Sebetić, C. Behrens, H. — Die Enterotoxämie der Schafe in Deutschland. Dtsch.tierärztl.Wschr. 61, 4, (1954)

34. Montgomerie, R.F. — (1) The prevention of pulpy kidney disease. Vet.Rec. 72, 995, (1960)

35. Oakley, C.L. Warrack, G.H. — Routine typing of Cl.welchii. J.Hyg. 51, 102, (1953)

36. Oppermann, T. — Randbemerkungen zu den Anaerobier-Krankheiten beim Schaf. Dtsch.tierärztl.Wschr. 57, 31, (1950)

37. Ott zit. nach: Hartwigk, H. Tzimas, P. — Die Züchtung von Anaerobiern auf Traubenzucker-Blut-Agar mit "Anoxydator"-Scheiben. Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 537, (1963)

38. Otten, E. Henze, S. — Bakteriologische Untersuchungen an der Tonsilla palatina des Hundes. Berl.Münch.tierärztl.Wschr.66,186 (1953)

39. Parish, W.E. — Necrotic enteritis in the fowl (Gallus domesticus). 1. Histopathology of the disease and isolation of the strain of Clostridium welchii. 2. Examination of the causal Clostridium welchii. J.Comp.Path. 71,377,(1961)

40. Renk, W.
Mastitiden bei Infektionen mit Cl. perfringens
Berl.Munch.tierarztl.Wschr.75,162,(1962)

41. Roberts, J.E. in: Stableforth, D.W. Galloway, J.A.
Infectious disease of animals. Disease due to bacteria, Vol 1
Butterworths, London (1959)

42. Robertson, M. Keppie, J.
Invitro toxin production from strains of Cl.welchii recently isolated from war-wounds
J.Path.Bact. 53, 95, (1941)

43. Schofield, F.W.
Enterotoxemia (sudden death) in calves to Clostridium welchii
J.Amer.Vet.Med.Ass. 126, 192, (1955)

44. Seffner, W.
Wesen und Vorbeuge des Labmagen-Pararauschbrandes und der Enterotoxämie der Schafe
Mhefte Vet.med. 14, 559, (1959)

45. Tomov, T. Ivanov, J. Surtmadjiev, K. Draganov, M.
Investigation into the spread of Clostridium perfringens Types A, C and D
Veterinärmedizinische Aufsatze, Heft 10, Sofia 1965

46. Tzimas, P.
Letalitätsprüfung im Mäusetest mit den 6 Typen des Cl.welchii unter Verwendung verschiedener flussiger Nährmedien
Vet.-med.Diss.Berlin FU (1964)

47. Van Heyningen, W.E.
Bacterial toxins
Blackwell, Oxford (1950)

48. Werner, H. Seeliger, H.P.R.
Kulturelle Untersuchungen über den Keimgehalt der Appendix unter besonderer Berücksichtigung der Anaerobier
Zbl.Bact.I.Orig. 188, 345, (1963)

49. Weymouth, D.K. Gersham, M. Chute, H.L.
Report of Clostridium in capons
Avian Dis. 7, 293, (1963)

50. Wildführ, G.
Zur Frage der Toxinsteigerung durch Kultur- und Tierpassagen bei Stämmen aus der Gruppe der Gasoedemerreger
Zschr.Hyg. 130, 521, (1949/50)

51. Wildführ, G.
Über die Bedeutung der Vorkultur für die Toxinbildung der Gasoedemerreger
Zschr.Hyg. 130, 529, (1949/50)

52. Willis, A.T.
Anaerobic Bacteriology in clinical medicine
Butterworth, London (1960)

53. Zeissler, J.
Krauspe, C.
Rassfeld-Sternberg, L.
Die Gasoedeme des Menschen Bd.1
Steinkopff, Darmstadt (1958)

54. Zeissler, J.
Rassfeld-Sternberg, L.
Zur Bakteriologie der Enteritis necroticans
Zbl.Bakt.I.Orig. 153, 304, (1948/49)

Herrn Prof. Dr. H. Hartwigk möchte ich für die Überlassung des Themas und für die mir jederzeit gewährte großzügige Unterstützung herzlich danken.

Allen Angestellten des Institutes sei für die mir gewährte Hilfe ebenfalls gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 18. 10. 1939 wurde ich als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Dr. Josef Tobesch und seiner Ehefrau Gabriela geb. Hönig in Troppau (Sudetenland) geboren.

Von 1947 bis 1953 absolvierte ich die Grundschule in Falkensee und West-Berlin. Anschließend besuchte ich die Herder-Westend-Schule in Berlin-Charlottenburg.

Nach Ablegung des Abiturs wurde ich im Sommersemester 1961 an der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. 1963 bestand ich das Physikum und im März 1966 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Die Praktikantenzeit habe ich am 1. April 1966 bei einem Großtierpraktiker in Wunsiedel (Oberfranken) begonnen.